

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>G01N 33/573, C12Q 1/48</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/23804</b> (43) Date de publication internationale: 27 avril 2000 (27.04.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02456</p> <p>(22) Date de dépôt international: 12 octobre 1999 (12.10.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/13211 21 octobre 1998 (21.10.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DECKER, Patrice [FR/FR]; 10, rue de Rimbach, F-67000 Strasbourg (FR). DE MURCIA, Gilbert [FR/FR]; 27, rue des Linottes, F-67100 Strasbourg (FR). MULLER, Sylviane [FR/FR]; 11, rue Beethoven, F-67000 Strasbourg (FR).</p> <p>(74) Mandataires: GROSSET-FOURNIER, Chantal etc.; Gros- set-Fournier &amp; Demachy, 20, rue de Maubeuge, F-75009 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Publiée</b> Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: METHOD FOR DETECTING THE ENZYMATIC ACTIVITY OF THE POLY(ADP-RIBOSE POLYMERASE) ENZYME</p> <p>(54) Titre: PROCEDE DE DETECTION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'ENZYME POLY(ADP-RIBOSE POLYMERASE)</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns the use of an anti-poly(ADP-ribose) antibody for detecting the enzymatic activity of the poly(ADP-ribose polymerase) (PARP) enzyme and for detecting the inhibiting or activating action of an inhibitor or an activator of said enzyme.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention a pour objet l'utilisation d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose) pour la détection de l'activité enzymatique de l'enzyme poly (ADP-ribose polymérase) (PARP) et de détection de l'activité inhibitrice ou activatrice d'un inhibiteur ou d'un activateur de cette enzyme.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## PROCÉDE DE DETECTION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'ENZYME POLY(ADP-RIBOSE POLYMERASE)

5

L'invention a pour objet un procédé de détection de l'activité enzymatique de l'enzyme poly(ADP-ribose polymérase) et de détection de l'activité inhibitrice ou  
10 activatrice d'un inhibiteur ou d'un activateur de cette enzyme.

La poly(ADP-ribosyl)ation est une modification post-traductionnelle majeure des protéines nucléaires. La poly(ADP-ribose) polymérase (PARP; EC 2.4.2.30), aussi appelée poly(ADP-ribose synthétase) (PARS) qui catalyse cette réaction, est une enzyme nucléaire basique de 113 kD dont la structure a été relativement bien  
15 conservée au cours de l'évolution. A partir du  $\text{NAD}^+$  ( $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide) son substrat, la PARP catalyse la polymérisation de résidus d'ADP-ribose en un homopolymère plus ou moins branché, le poly(ADP-ribose), qui est lié à des protéines nucléaires acceptrices (Figure 1A). Parmi les protéines acceptrices connues, on relèvera que la PARP elle-même  
20 représente le principal accepteur de poly(ADP-ribose) (phénomène d'automodification dont le site se situe au niveau du domaine D de l'enzyme; Figure 1B). Quelques autres protéines nucléaires sont des accepteurs de poly(ADP-ribose), par exemple les histones H1 et H2B ou les topoisomérases I et II qui sont modifiées sur des résidus d'acide glutamique (hétéromodification). La liaison du poly(ADP-ribose) à ces  
25 protéines nucléaires affecte considérablement leur structure et leurs fonctions en réduisant notamment leur affinité pour l'ADN. L'activité de base de la PARP est fortement stimulée par la présence de coupures simple brin (et à moindre échelle double brin) dans l'ADN qui sont générées par des agents génotoxiques tels que radiations ionisantes, agents alkylants monofonctionnels, agents antitumoraux et  
30 dommages oxydatifs. La reconnaissance de ces interruptions du squelette sucre-phosphate de l'ADN par l'enzyme s'effectue par l'intermédiaire de deux motifs en doigt de zinc, appelés F1 et F2, localisés dans le domaine N-terminal (domaine A;

Figure 1B). Du fait de ces propriétés de reconnaissance de "cassures" ou de lésions de l'ADN, on a attribué à la PARP toute une série de fonctions potentielles dans les grandes voies métaboliques cellulaires telles que transcription, réplication et réparation. En particulier, des données récentes indiquent très clairement que la PARP participe activement à la réparation par excision de bases (BER). Au cours de la mort cellulaire programmée, son clivage par les caspases au niveau du domaine B (résidu d'acide aspartique 214; Figure 1B), survenant en même temps que celui d'autres enzymes de réparation et de protéines structurales nucléaires, empêche une réparation futile et assure l'irréversibilité rapide de la phase d'exécution de l'apoptose.

S'agissant de la détection de l'activité enzymatique de la PARP ou de la détection d'inhibiteurs ou d'activateurs de la PARP, les techniques actuellement décrites dans la littérature utilisent du NAD radioactif ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$  ou  $^3\text{H}$ -NAD) (Niedergang C., Okazaki H. and Mandel P. (1979) Properties of purified calf thymus poly (Adenosine diphosphate ribose) polymerase. *Eur. J. Biochem.* 102, 43-57).

On peut citer également d'autres auteurs qui utilisent toujours des tests similaires basés sur l'emploi du NAD radioactif, par exemple :

- Banasik et al. (1992) Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J. Biol. Chem.* 267, 1569-1575.

- Panzeter and Althaus (1994) DNA strand break-mediated partitioning of poly(ADP-ribose) polymerase function. *Biochemistry* 33, 9600-9605.

- Shah et al. (1995) Review: Method for biochemical study of poly(ADP-ribose) metabolism in vitro and in vivo. *Anal. Biochem.* 227, 1-13.

- Shah et al. (1996) Complete inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity prevents the recovery of C3H10T1/2 cells from oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1312 1-7.

- Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Ménissier de Murcia J. and de Murcia G. (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3563-3571.

Le principe de base de ces essais consiste à immobiliser la PARP, ou des extraits contenant la PARP, sur un filtre (par exemple de la nitrocellulose) et de l'incuber avec tous les éléments réactionnels nécessaires, dont du NAD radioactif. La radioactivité incorporée dans les unités d'ADP-ribose (voir figure 1A) est mesurée par autoradiographie du filtre (test d'activité sur membrane). Le test peut aussi être réalisé en phase liquide, le mélange est filtré après précipitation à l'acide trichloracétique (TCA) et la radioactivité incorporée est mesurée sur le filtre par des méthodes classiques. En règle générale, lorsque les utilisateurs testent la PARP purifiée, les tests sont réalisés en présence d'une protéine exogène, acceptrice de poly(ADP-ribose). Il s'agit souvent d'histones (voir par exemple la revue technique rédigée par Shah et al. (1995) Method for biochemical study of poly(ADP-ribose) metabolism *in vitro* and *in vivo*. *Anal. Biochem.* **227**, 1-13).

Par ailleurs, les inhibiteurs de la PARP du type 3-amino benzamide (3-AB) sont généralement utilisés dans une fourchette de concentration du mM. On peut noter page 1573 de l'article de Banasik et al. (1992) intitulé "Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase" *J. Biol. Chem.* **267** (pages 1569-1575) que ces auteurs classent les inhibiteurs en 5 catégories dont ceux qui ont des  $IC_{50} < 25 \mu M$  qui sont considérées comme "très fortes". Ces auteurs ont décrit 4 inhibiteurs dont les  $IC_{50}$  sont  $< 1 \mu M$  (à savoir entre 180 et 390 nM). Le test qu'ils ont utilisé est un test radioactif en phase liquide.

Il est d'usage courant pour l'homme de métier de dire que les tests radioactifs (RIA) sont plus sensibles que les tests immunoenzymatiques. Les tests ELISA sont cependant souvent favorisés car ils n'utilisent pas de radioactivité, considérée comme contraignante au regard de la sécurité, des coûts engendrés par l'achat des réactifs, de leur manipulation et de leur élimination. Pour augmenter la sensibilité des tests ELISA, de nouveaux systèmes de détection ont été introduits, tels que des révélations par fluorescence et chimiluminescence, par exemple. Même si des formats d'ELISA élaborés peuvent être utilisés, dans le meilleur des cas on prétend à des sensibilités similaires en ELISA et RIA (voir la préface du livre de J.R. Crowther "ELISA, theory and practice" dans "Methods in Molecular Biology", vol. 42, Humana Press, (1995).

On notera de plus que les tests "radioactifs" de type test d'activité sur membrane sont certes visuels, puisqu'on dispose d'un film d'autoradiographie, mais ne sont pas du tout quantitatifs.

Par ailleurs, à ce jour, la sensibilité des tests de mesure d'activité enzymatique de la PARP ne permet pas de détecter des inhibiteurs spécifiques de la PARP ayant une activité lorsqu'ils sont testés à des concentrations de l'ordre de quelques nanomoles/litre. ou de quelques dizaines de nanomoles/litre.

L'invention a pour objet un procédé de détection de l'activité enzymatique de la PARP, par un test facile à mettre en œuvre, rapide, spécifique et extrêmement sensible.

L'invention a également pour objet un procédé de détection de l'activité enzymatique de la PARP, par un test qui ne fait pas appel à la radioactivité.

L'invention a également pour objet un procédé permettant d'étudier des séries importantes de molécules, ou un mélange de molécules, destinés à inhiber et éventuellement augmenter l'activité de la PARP.

L'invention a également pour objet un procédé permettant de détecter des inhibiteurs ou des activateurs de la PARP en quantités qui peuvent être excessivement faibles, de l'ordre du nanomolaire.

Ces différents aspects ont été obtenus par l'utilisation d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose) pour la détection de l'inhibition (ou de l'activation) de l'activité enzymatique de l'enzyme poly (ADP-ribose polymérase) (PARP).

On a trouvé, contre toute attente, que l'utilisation d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose) pour la détection de l'inhibition ou de l'activation de l'activité enzymatique de la PARP s'avérait être une méthode plus sensible que les méthodes de l'art antérieur faisant appel à la radioactivité.

On définit l'activité de la PARP par l'évaluation de la quantité de poly(ADP-ribose) synthétisé en présence de tous les réactifs de la réaction enzymatique (notamment substrat et co-facteur de l'enzyme).

L'invention concerne l'utilisation d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose) pour la détection de l'activité enzymatique de la PARP, en vue de la quantification de l'activité inhibitrice ou activatrice d'un inhibiteur ou activateur de la PARP, par mesure de la variation de l'activité de la PARP.

On définit l'inhibition de la PARP par la diminution de la quantité de poly(ADP-ribose) synthétisé en présence de tous les réactifs de la réaction enzymatique (notamment substrat et co-facteur de l'enzyme) et d'un inhibiteur donné.

5 Quant à l'activation de la PARP, elle est sous la dépendance de coupures "simple brin" (et dans une moindre mesure double brin) dans l'ADN. En l'absence de l'activateur, on observe une synthèse de poly(ADP-ribose) faible qui correspond à l'activité dite basale de l'enzyme. La synthèse de poly(ADP-ribose) est très fortement stimulée par la présence de ADN contenant des cassures ou coupures.  
10 L'ADN "intact" n'est pas un bon activateur.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'inhibiteur de la PARP ou l'activateur de la PARP est présent à des doses inférieures ou égales à environ 250 nM, notamment inférieures ou égales à environ 100 nM et avantageusement comprises entre environ 25 et environ 100 nM.

15 L'invention concerne également un procédé de détection de l'activité de la PARP comprenant une étape de détection de la liaison entre la PARP et le poly(ADP-ribose) à l'aide d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose).

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de détection de l'activité de la PARP en vue de la détection de l'activité inhibitrice ou activatrice d'un inhibiteur  
20 ou d'un activateur de la PARP, comprend :

- une étape de mesure de l'activité de la PARP, en l'absence d'activateur et d'inhibiteur de PARP, par détection de la liaison entre la PARP et le poly(ADP-ribose) à l'aide d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose),
- une étape de mesure de l'activité de la PARP, en présence d'un activateur ou  
25 d'un inhibiteur de la PARP, par détection de la liaison entre la PARP et le poly(ADP-ribose) à l'aide d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose),

les deux étapes de mesure définies ci-dessus étant effectuées dans un ordre quelconque,

- et une étape de comparaison des activités de la PARP obtenues respectivement  
30 dans chacune des deux étapes définies ci-dessus.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, le procédé de détection de l'activité de la PARP comprend les étapes suivantes :

- adsorption de la PARP contenue dans un milieu d'adsorption, sur un support,  
- addition, à la PARP adsorbée, d'un milieu de réaction contenant les éléments  
nécessaires à la mise en activité de la PARP, et résultant en la synthèse de  
poly(ADP-ribose) et à la liaison du poly(ADP-ribose) à au moins une protéine  
nucléaire acceptrice présente dans le milieu, ou adsorbée

- addition au milieu contenant la PARP d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose)  
dans des conditions permettant la formation d'un complexe anticorps-antigène avec le  
poly(ADP-ribose) lié à la PARP,

- détection de la formation du susdit complexe antigène-anticorps et mesure de  
l'activité enzymatique correspondante de la PARP.

L'invention concerne également un procédé de détection de l'activité de la  
PARP en vue de la détection de l'activité inhibitrice ou activatrice d'un inhibiteur ou  
d'un activateur de la PARP, comprenant les étapes suivantes :

- adsorption de la PARP contenue dans un milieu d'adsorption, sur un support,  
- addition, à la PARP adsorbée, d'un milieu de réaction contenant

. un inhibiteur ou un activateur de la PARP,

. les éléments nécessaires à la mise en activité de la PARP, et  
résultant en la synthèse de poly(ADP-ribose) et à la liaison du poly(ADP-ribose)  
à au moins une protéine nucléaire acceptrice présente dans le milieu,

- addition, au milieu contenant la PARP, d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose)  
dans des conditions permettant la formation d'un complexe anticorps-antigène avec le  
poly(ADP-ribose) lié à la PARP,

- détection de la formation du susdit complexe antigène-anticorps, et mesure de  
l'activité enzymatique correspondante de la PARP,

- comparaison de la mesure de l'activité enzymatique de la PARP obtenue lors  
de la détection de la formation du susdit complexe antigène-anticorps avec la mesure  
de l'activité enzymatique de la PARP obtenue lors de la détection de la formation du  
complexe antigène-anticorps obtenu selon la mise en œuvre du procédé de détection  
de l'activité de la PARP qui fait l'objet du paragraphe précédent.



De façon avantageuse, dans le procédé de l'invention, la protéine nucléaire acceptrice de poly(ADP-ribose) est la PARP. En d'autres termes, selon un mode de réalisation avantageux, il n'y a pas de protéine nucléaire acceptrice exogène.

5 Selon un autre mode de réalisation, dans le procédé de l'invention, la protéine nucléaire acceptrice de poly(ADP-ribose) est choisie parmi des histones, des protéines HMG ("High Mobility Group" : protéines du groupe des protéines de haute mobilité), des topoisomérases, des ADN polymérases et des ligases, et de préférence des histones.

10 De façon avantageuse, dans le procédé de l'invention, l'adsorption de la PARP a lieu dans un milieu d'adsorption contenant un composé susceptible de jouer le rôle d'écran entre l'ADN lésé et le polymère de poly(ADP-ribose) tel que la spermine ou la spermidine, ou avantageusement du  $MgCl_2$ , et un agent favorisant la formation de doigts de zinc, avantageusement  $ZnCl_2$ .

15 Le polymère ayant sensiblement la même charge que l'ADN lésé, la compétition entre l'ADN lésé et le polymère est diminuée par la présence de  $Mg_2^+$ , avantageusement sous forme  $MgCl_2$ .

Selon un autre mode de réalisation, dans le procédé de l'invention, le milieu de réaction contenant les éléments nécessaires à la mise en activité de la PARP comprend:

- 20
- le substrat de la PARP, avantageusement du  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>,
  - un co-facteur de la PARP, avantageusement de l'ADN lésé,
  - un agent réducteur, notamment du DTT,
  - un composé susceptible de jouer le rôle d'écran entre l'ADN lésé et le polymère de poly(ADP-ribose) tel que la spermine ou la spermidine, ou
- 25
- avantageusement  $MgCl_2$  et un agent favorisant la formation de doigts de zinc, avantageusement  $ZnCl_2$ .

30 Selon un autre mode de réalisation, dans le procédé de l'invention, l'anticorps anti-poly(ADP-ribose), lors de son addition au milieu contenant la PARP, est dilué dans un milieu de dilution permettant d'éviter les réactions non spécifiques éventuelles, et avantageusement contenant de l'albumine sérique de bœuf (BSA).

Selon un autre mode de réalisation, dans le procédé de l'invention, l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) est un anticorps polyclonal, par exemple l'anticorps

LP 96-10 polyclonal commercialisé par BioMol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA, Cat N° SA-276), ou un anticorps induit chez le cochon d'Inde (anticorps polyconal : réf. SA-217, Plymouth Meeting, PA), ou un anticorps non commercial, préparé au laboratoire, ou un anticorps monoclonal tel que l'anticorps 10H commercialisé par Serotec (Cat n° MCA 1480 ; Oxford, UK ou par Travigen Inc., Gaithersburg, MD, USA).

La détection du complexe poly(ADP-ribose)-anticorps anti-poly(ADP-ribose) peut être effectuée par des techniques classiques tel que : spectrophotométrie, fluorescence, chimiluminescence, en utilisant par exemple un deuxième anticorps couplé à une enzyme révélée par un substrat et un chromogène, ou un réactif fluorescent ou chimiluminescent.

De façon avantageuse, dans le procédé de l'invention, la détection du complexe poly(ADP-ribose)-anticorps anti-poly(ADP-ribose) (premier anticorps) est effectué à l'aide d'un deuxième anticorps dirigé contre l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) et conjugué à une enzyme, et la liaison entre l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) et le deuxième anticorps est par exemple révélé par réaction colorimétrique, notamment provoquée par l'addition d'un substrat de l'enzyme et d'un chromogène.

L'importance de la réaction colorée (densité optique) est mesurée par spectrophotométrie.

Dans le cas particulier visé ci-dessus, il s'agit d'un test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (immunoenzymatique).

Les tests ELISA sont par exemple définis dans le livre J.R. Crowther "*ELISA, theory and practice*" dans "*Methods in Molecular Biology*", vol. 42, Humana Press, (1995).

Selon un autre mode de réalisation, dans le procédé de l'invention, la PARP est utilisée à raison d'environ 200 à environ 600 ng/ml, l'ADN lésé est utilisé à raison d'environ 1 à 1,5 µg/ml, le ZnCl<sub>2</sub> est utilisé à raison d'environ 10 à 30 µM, MgCl<sub>2</sub> est utilisé à raison d'environ 3 à 5 mM, le NAD<sup>+</sup> 25 à 75 µM, le DTT est utilisé à raison d'environ 0,8 à 1,2 mM, l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) est utilisé à raison d'environ 1/500 à environ 1/2000, la BSA dans le milieu de dilution de l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) est utilisée à raison d'environ 0,2 à environ 0,6 % (p/v).

De façon plus détaillée, le procédé de l'invention de détection de l'activité enzymatique de la PARP comprend les étapes suivantes :

5 - adsorption de la PARP contenue dans un milieu d'adsorption, sur des plaques de microtitration en plastique, et lavage de la PARP non adsorbée,

- addition, à la PARP adsorbée, d'un milieu de réaction contenant les éléments nécessaires à la mise en activité de la PARP, et notamment de l'ADN lésé, du  $\text{NAD}^+$ , et un composé susceptible d'éviter l'oxydation des résidus de cystéine, conduisant à la synthèse de poly(ADP-ribose) et à la liaison de celui-ci sur une protéine nucléaire  
10 acceptrice présente dans le milieu ou adsorbée, notamment la PARP, et lavage des éléments non liés à la PARP,

- addition, au milieu contenant de la PARP, d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose) contenu dans un milieu de dilution pour former un complexe antigène-anticorps avec le poly(ADP-ribose) lié sur la PARP ou sur la protéine  
15 acceptrice et lavage de l'anticorps qui n'a pas formé de complexe,

- addition d'un 2ème anticorps spécifique de l'espèce d'origine de l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) conjugué à une enzyme pour former un complexe antigène-anticorps avec l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) et lavage du deuxième anticorps qui  
20 n'a pas formé de complexe,

- addition du substrat au susdit enzyme et d'un chromogène,  
- développement de la réaction colorimétrique puis arrêt de cette réaction par  
25 addition d'une solution acide,

- détermination de l'activité enzymatique de la PARP en mesurant l'intensité de la réaction par exemple par mesure de la densité optique (DO).

25 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention le procédé de détection de l'activité enzymatique de la PARP en vue de la quantification de l'activité inhibitrice ou activatrice d'un inhibiteur ou activateur de PARP comprend les étapes suivantes :

30 - adsorption de la PARP contenue dans un milieu d'adsorption sur des plaques de microtitration en plastique, et lavage de la PARP non adsorbée,

- addition à la PARP adsorbée d'un milieu de réaction contenant les éléments nécessaires à la mise en activité de la PARP, et notamment de l'ADN lésé, du  $\text{NAD}^+$

et un composé susceptible d'éviter l'oxydation des résidus de cysteine, conduisant à la synthèse de poly(ADP-ribose) et à la liaison de celui-ci sur une protéine nucléaire acceptrice présente dans le milieu, ou adsorbée, notamment la PARP, et un inhibiteur ou un activateur de la PARP et lavage des éléments non liés à la PARP,

5        - addition, au milieu contenant de la PARP, d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose) contenu dans un milieu de dilution pour former un complexe antigène-anticorps avec le poly(ADP-ribose) lié sur la PARP ou sur n'importe quelle protéine acceptrice et lavage de l'anticorps qui n'a pas formé de complexe,

10        - addition d'un 2ème anticorps spécifique de l'espèce d'origine de l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) conjugué à une enzyme pour former un complexe antigène-anticorps avec l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) et lavage du deuxième anticorps qui n'a pas formé de complexe,

          - addition du substrat du susdit enzyme et d'un chromogène,

15        - développement de la réaction colorimétrique puis arrêt de cette réaction par addition d'une solution acide,

          - détermination de l'activité enzymatique de la PARP en mesurant l'intensité de la réaction par exemple par mesure de la densité optique (DO),

20        - comparaison des activités enzymatiques de la PARP respectivement obtenues à l'étape précédente et à l'issue du procédé sus-défini de détection de l'activité enzymatique de la PARP, qui fait l'objet du paragraphe précédent.

Selon un mode de réalisation avantageux, le milieu de réaction contenant les éléments nécessaires à la mise en activité de la PARP contient également un composé susceptible d'éviter l'oxydation des résidus de cysteine de la PARP, tel que le dithiothreitol (DTT).

25        ... Comme support d'adsorption de la PARP, on peut utiliser des plaques ELISA, par exemple en chlorure de polyvinyle (PVC).

Le milieu utilisé, d'une part pour l'adsorption de la PARP (milieu d'adsorption) et, d'autre part, comme milieu de réaction à la composition suivante : 50 mM Tris-HCl, pH 8, contenant 4mM  $MgCl_2$  et 20  $\mu M$   $ZnCl_2$ .  $MgCl_2$  peut être remplacé par tout composé susceptible de jouer un rôle d'"écran" entre l'ADN lésé et le poly(ADP-ribose), et donc augmente la synthèse de poly(ADP-ribose). On peut utiliser également la spermine ou la spermidine.

30

Du  $\text{ZnCl}_2$  peut être remplacé par tout sel de Zn susceptible de favoriser la formation des doigts de zinc.

Des conditions d'adsorption appropriées sont par exemple de 5h à 16h, à 4°C.

5. Le tampon de lavage des éléments non liés à la PARP est généralement PBS-T (composition saline tamponnée au phosphate, voir exemple 1), et contient un détergent doux évitant la liaison faible de certaines molécules, tel que Tween 20 (commercialisé par Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne, N0 CAT 27, 434-8 ou Sigma référence P1379).

10 L'ADN lésé est un co-facteur de la PARP. Cet ADN activé par incubation avec de la DNase I a une longueur de 100-200 pb. Il peut être préparé selon le procédé décrit par Mazen A., Ménissier-de Murcia J., Molinete M., Simonin F., Gradwohl G., Poirier G.G. and de Murcia G. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 4689-4698. On peut également avoir recours à de l'ADN commercial (réf. Ladder MIX, MBI  
15 Fermentas, maison-mère à Vilnius, Lithuanie, distribué en France par Euromedex, ref. SM0331, lot AS05, longueur: 100 à 10000pb).

Le  $\text{NAD}^+$ , le  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide est le substrat de la PARP. L' $\alpha$ -NAD est inactif et ne peut remplacer le  $\beta$ - $\text{NAD}^+$ .

20 Comme anticorps anti-poly(ADP-ribose), on peut utiliser un anticorps monoclonal tel que l'anticorps 10H ou du sérum de lapin anti-poly(ADP-ribose).

Le milieu de dilution de l'anticorps contient par exemple 0,4% d'albumine sérique de bœuf (BSA) afin d'éviter les réactions non spécifiques éventuelles.

25 Le deuxième anticorps permet de visualiser et quantifier la liaison du premier anticorps au poly(ADP-ribose). Dans le cas de l'anticorps monoclonal 10H, il s'agit d'un conjugué anti-IgG3 de souris lié à la peroxydase de raifort; dans le cas du sérum de lapin anti-poly(ADP-ribose), il s'agit d'un conjugué anti-IgG de lapin lié à la peroxydase. Le conjugué anti-IgG3 de souris lié à la peroxydase peut être remplacé par un conjugué anti-Ig totales de souris (reconnaissant les IgG3) lié à la peroxydase.

30 De façon avantageuse, le couple substrat/chromogène est  $\text{H}_2\text{O}_2$ -tétraméthyl benzidine, TMB. Le système peroxydase/  $\text{H}_2\text{O}_2$ -TMB permet également d'utiliser des temps courts d'incubation des réactifs.

Pour arrêter la réaction colorimétrique entre le chromogène et le substrat de l'enzyme lié au susdit deuxième anticorps, on peut utiliser l'acide chlorhydrique (par exemple HCl, 1M), ou de l'acide sulfurique (par exemple H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5M).

5 S'agissant des gammes de concentration des composants essentiels du test mis en œuvre dans le procédé de l'invention, elles sont avantageusement les suivantes :

- PARP	400 ± 200 ng/ml
- ADN "lésé"	1,25 ± 0,25 µg/ml
- NAD <sup>+</sup> additionné au milieu de réaction de la PARP	50 ± 25 µM
- ZnCl <sub>2</sub> dans le milieu de réaction et d'adsorption de la PARP	20 ± 10 µM
- MgCl <sub>2</sub> dans le milieu de réaction et d'adsorption de la PARP	4 ± 1 mM
- DTT additionné au milieu de réaction de la PARP	1 ± 0.2 mM
- Anticorps monoclonal anti-poly(ADP-ribose)	1/1600 (1/500 à 1/2000)
(surnageant de culture, donc à calibrer pour chaque nouveau lot).	
- BSA dans le milieu d'incubation du 1er anticorps	0,4 ± 0,2 % (p/v)
(dépend du lot de BSA utilisé, donc à calibrer pour chaque nouveau lot).	

10 La spécificité étroite des réactifs immunologiques suivants a été particulièrement étudiée :

- anticorps monoclonal anti-poly(ADP-ribose),
- sérum de lapin anti-poly(ADP-ribose),
- 15 - conjugué anti-IgG de lapin/souris lié à la peroxydase.

On a pu montrer que les anticorps anti-poly(ADP-ribose) ne réagissent ni avec la PARP, ni avec l'ADN. Le conjugué anti-IgG de lapin/souris lié à la peroxydase ne réagit ni avec la PARP, ni avec l'ADN lésé, ni avec le poly(ADP ribose).

20 L'invention concerne également un kit pour la détection de l'activité enzymatique de la PARP, éventuellement en vue de la détection de l'activité inhibitrice ou activatrice d'un inhibiteur ou d'un activateur de la PARP comprenant :

- l'enzyme PARP,
- les milieux ou tampons nécessaires à l'adsorption de la PARP sur un support utilisable dans un procédé ELISA,

- les milieux ou tampons permettant la mise en activité de l'enzyme PARP,
- au moins un anticorps anti-poly(ADP-ribose),
- les milieux ou tampons permettant la dilution du susdit anticorps,
- 5 - les milieux ou tampons permettant la formation de complexe antigène-anticorps entre le poly(ADP-ribose) et l'anticorps anti-poly(ADP-ribose),
- éventuellement un deuxième anticorps susceptible de former un complexe avec l'anticorps anti-poly(ADP-ribose), éventuellement marqué par une enzyme,
- éventuellement le substrat de la susdite enzyme, et un chromogène ainsi que
- 10 l'acide stoppant la réaction,
- éventuellement les milieux ou tampon permettant la formation d'un complexe antigène-anticorps entre l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) et le susdit deuxième anticorps,
- éventuellement au moins un inhibiteur ou un activateur de la PARP
- 15 susceptible d'être utilisé comme témoin interne.

### LEGENDE DES FIGURES

20 La Figure 1A correspond au métabolisme du poly(ADP-ribose) et la Figure 1B représente la structure modulaire de la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP, 113 kDa). Dans la Figure 1B :

- la partie A correspond au domaine de liaison de l'ADN, la partie B correspond au signal de localisation nucléaire (NLS), la partie C correspond à un domaine dont la fonction n'est pas encore connue, la partie D correspond au domaine
- 25 d'auto modification, la partie E appartient au domaine catalytique, et la partie F est le domaine catalytique,
- F1 et F2 sont respectivement des doigts de zinc,
- N correspond à l'extrémité N-terminale et C à l'extrémité C-terminale.

30 Les Figures 2A et 2B représentent l'inhibition de l'activité de la PARP en utilisant des dilutions en série respectivement de l'inhibiteur 3-MB (A) et NU1025 (B)

en ELISA. Les conditions de tests sont décrites dans l'exemple 1 ci-après. On a porté, sur l'axe des ordonnées, les valeurs de l'absorbance (ou densité optique) à 450 nm.

On donne ci-après le Tableau 1 correspondant à cette figure.

Tableau 1

Inhibiteurs	IC50 (nM)
Benzamide	500
3 AB	2 000
4 AB	>> 5 000
3 MB	600
NU 1025	40
DHIQ	1 000
Nicotinamide	non calculable

La Figure 3 représente la détection en ELISA de l'inhibition de l'activité de la PARP en utilisant une série d'inhibiteurs de PARP testés à 1  $\mu$ M. Les conditions de tests sont décrites dans l'exemple 1. L'étendue de l'activité inhibitrice des composés testés est exprimée sur l'axe des ordonnées en pourcentage d'inhibition =  $100 - [(valeur\ de\ DO\ avec\ inhibiteur - valeur\ de\ DO\ du\ bruit\ de\ fond / valeur\ de\ DO\ sans\ inhibiteur - valeur\ de\ DO\ du\ bruit\ de\ fond) \times 100]$ . Le bruit de fond est  $\leq$  à 0,15 unité de DO et correspond à l'absorbance moyenne mesurée dans des puits dans laquelle toutes les étapes du test ELISA sont effectuées en utilisant tous les réactifs sauf le NAD<sup>+</sup>.

Références des composés testés : benzamide (Sigma B-2009), 3-AB (Sigma A-0788), 4-AB (Sigma A-1658), 3-MB (Sigma-Aldrich, M1,005-0), NU1025 (don du Dr. D. Newell), 1,5-dihydroxyisoquinoline (DHIQ ; Sigma-Aldrich 28-191-3), nicotinamide ou niacinamide (NAM ; Sigma N-3376).

Il faut noter que pour déterminer la valeur IC50 de chacun des inhibiteurs, ceux-ci ont été testés à des valeurs dans la gamme allant de 10 nM à 8000 nM.

Dans ce qui précède et dans ce qui suit, DO signifie densité optique.



La Figure 4 représente la comparaison des niveaux d'activités mesurés en utilisant l'anticorps monoclonal 10H et des anticorps polyclonaux anti-poly(ADP-ribose) (voir Exemple 3). La première surface correspond à l'utilisation de l'anticorps monoclonal 10H, la deuxième surface correspond à celle d'anticorps polyclonaux, et la troisième surface à celle d'un témoin sans anticorps. La densité optique est portée en ordonnées, à 450 nm.

La Figure 5 représente le niveau d'activité mesuré en présence et en absence d'une protéine acceptrice exogène (voir Exemple 4).

Les deux premières surfaces correspondent à l'utilisation de la PARP seule, et les deux dernières surfaces correspondent à l'utilisation de PARP et de l'histone H1. Les surfaces en gris correspondent à la réaction en l'absence d'inhibiteur, et les surfaces en blanc correspondent à la réaction en présence de l'inhibiteur 3 MB (1  $\mu$ M). La densité optique est portée en ordonnées, à 450 nm.

#### Exemple 1

De la PARP recombinante humaine (400 ng/ml dans un tampon Tris contenant 50 mM Tris ajusté à pH 8 avec HCl, 20  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> et 4 mM de MgCl<sub>2</sub> ; 200  $\mu$ l/puits) est immobilisé sur des plaques de microtitration en chlorure de polyvinyle (Falcon, réf. 3912). Le même résultat final est obtenu lorsque les plaques sont recouvertes par incubation toute la nuit (16h) ou simplement 5h. Après 3 lavages avec du PBS-T ("Phosphate Buffered Saline-Tween") (tampon phosphate salin contenant du Tween 20), 150 mM pH 7,4 [PBS-T = KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,47 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (8,09 mM), KCl (2,68 mM), NaCl (0,14 M), Thimerosal 494  $\mu$ M (préservatif anti-bactérien), Tween 20 (0,05% v/v)], 1,25  $\mu$ g/ml d'ADN lésé préparé comme décrit selon la référence de Mazen et al. (Mazen, A., Ménissier-de Murcia, J., Molinete, M., Simonin, F., Gradwohl, G., Poirier, G.G. and de Murcia, G., 1989, "Nucleic Acids Res.", 17, pp.4689-4698) et dilué dans du tampon Tris décrit ci-dessus et additionné de 50  $\pm$  25  $\mu$ M  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> (Boehringer-Manheim, réf. 127965) et 1 mM de DTT fraîchement préparé est incubé pendant 1h (200  $\mu$ l/puits) = "milieu réactionnel". Après 3 lavages avec PBS-T, la synthèse de poly(ADP-ribose) par la

PARP activée est détectée en utilisant l'anticorps monoclonal 10H (surnageant de culture dilué à 1/1600 dans du PBS-T contenant 0,4 % de BSA ; 200 µl/puits). Après 1h d'incubation à 37°C et 3 lavages avec PBS-T, du conjugué chèvre anti-IgG3 de souris couplé à la peroxydase (Nordic) dilué à 1/5000 dans du PBS-T (200 µl/puits) est ajouté pendant 30mn à 37°C. Après une série finale de lavages (2 fois avec PBS-T et une fois avec H<sub>2</sub>O), la réaction positive est visualisée par TMB (3,3', 5,5'-tétraméthyl-benzidine) en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 15 mn à 37°C (150 µl/puits). La réaction est arrêtée par addition de 50 µl HCl (concentration finale à 0,25 M) et l'absorbance est mesurée à 450nm. Pour l'étude d'inhibiteurs/activateurs potentiels de la PARP, les composés à tester sont ajoutés dans le milieu réactionnel.

Toutes les étapes de test d'ELISA sont effectuées à 4°C, sauf lorsque c'est indiqué différemment.

### Exemple 2

La PARP recombinante humaine (400 ng/ml dans le "tampon Tris" défini ci-dessus (200 µl/cupule) est immobilisée par adsorption sur des plaques de microtitration en chlorure de polyvinyle (Falcon, ref. 3912). La réaction se poursuit en une nuit à 4°C.

On effectue ensuite trois (3) lavages de la plaque avec du PBS-T (pH 7,4).

La composition du tampon est celle donnée à l'exemple 1.

On additionne 1,25 µg/ml ADN "lésé", préparé comme décrit par Mazen et al. (réf. ci-dessus) et dilué dans le "tampon Tris" défini ci-dessus contenant en plus 50 ± 25 µM β-NAD<sup>+</sup> (Boehringer-Manheim, ref. 127965), 1 mM de DTT (fraîchement préparé) et l'inhibiteur à tester (200 µl/cupule). L'inhibiteur à tester est ajouté dans la gamme de 10 nM à 8000 nM. L'incubation a lieu pendant 1 heure à 4°C.

On effectue ensuite trois (3) lavages de la plaque avec du PBS-T ayant la composition donnée ci-dessus.

La synthèse de poly(ADP-ribose) par la PARP activée est ensuite détectée par addition de l'Ac monoclonal 10H (surnageant de culture dilué 1/1600 dans du PBS-T contenant en plus 0,4% BSA; 200 µl/cupule). On effectue ensuite une incubation 1 heure à 37°C.

On effectue ensuite trois (3) lavages de la plaque avec du PBS-T (cf 13.1.2).

On additionne du conjugué chèvre anti-IgG3 de souris couplé à la peroxydase (Nordic) dilué 1/5000 dans du PBS-T (200  $\mu$ l/cupule). On fait incuber 30 min à 37°C, puis on effectue deux (2) lavages de la plaque avec du PBS-T (et un (1) lavage à l'eau.

On visualise la réaction finale en ajoutant le chromogène 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150  $\mu$ l/cupule). On effectue une incubation 15 min à 37°C.

La réaction est arrêtée en ajoutant 50  $\mu$ l HCl (concentration finale 0,25M).

L'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

### Exemple 3

Cet exemple est un exemple comparatif entre la mise en œuvre du procédé décrit à l'Exemple 1 et utilisant un anticorps polyclonal ou monoclonal pour la détection du poly(ADP-ribose) (voir Figure 4).

- Les résultats obtenus dans chaque cas sont identiques.

### Exemple 4

Cet exemple concerne la comparaison de la mise en œuvre du procédé de l'invention respectivement en présence ou en l'absence d'une protéine acceptrice (autre que la PARP elle-même) (voir Figure 5).

Comme protéine acceptrice hétérologue, on a testé l'histone H1 pure qui est la principale histone qui peut être poly(ADP-ribosyl)ée. Dans ce cas, l'histone H1 (400ng/ml) et la PARP sont adsorbées sur la plaque. On note sur la figure qu'en présence d'une protéine acceptrice hétérologue le signal d'activité (DO) est sensiblement diminué. Ceci peut affecter la sensibilité et la variabilité de la détection de l'inhibition du signal en présence d'un inhibiteur à tester. On aura donc de préférence recours à l'utilisation de la PARP seulement, sans protéine acceptrice hétérologue.

Exemple 5

Cet exemple concerne la mise en œuvre du procédé de l'invention dans lequel l'un des composants essentiels du test est omis.

5 L'effet de l'absence des différents composants suivants a été testé : PARP, ADN "lésé",  $\text{NAD}^+$ , anticorps anti-poly(ADP-ribose), et DTT. Dans tous les cas, la réaction finale s'avère complètement négative (Tableau 2). On a observé qu'en l'absence de  $\text{ZnCl}_2 + \text{MgCl}_2$  dans le milieu, la réaction (DO) est nettement diminuée (0,45 unité DO, au lieu de 1,37).

10 Les résultats sont donnés dans le Tableau 2 ci-après.

Tableau 2

Composants omis	DO obtenue
<u>aucun</u>	<u>1,37</u>
PARP	0,10
ADN "lésé"	0,14
$\text{NAD}^+$	0,17
anticorps anti-poly(ADP-ribose)	0,10
DTT	0,10
$\text{MgCl}_2$ et $\text{ZnCl}_2$	0,45

## REVENDICATIONS

5 1. Utilisation d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose) pour la détection de l'activité enzymatique de l'enzyme poly (ADP-ribose polymérase) (PARP).

10 2. Utilisation d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose) pour la détection de l'activité enzymatique de la PARP selon la revendication 1, en vue de la quantification de l'activité inhibitrice ou activatrice d'un inhibiteur ou activateur de la PARP, par mesure de la variation de l'activité de la PARP.

15 3. Utilisation selon la revendication 2, dans laquelle l'inhibiteur de la PARP ou l'activateur de la PARP est présent à des doses inférieures ou égales à environ 250 nM, notamment inférieures ou égales à environ 100 nM et avantageusement comprises entre environ 25 et environ 100 nM.

20 4. Procédé de détection de l'activité de la PARP comprenant une étape de détection de la liaison entre la PARP et le poly(ADP-ribose) à l'aide d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose).

5. Procédé de détection de l'activité de la PARP selon la revendication 4, en vue de la détection de l'activité inhibitrice ou activatrice d'un inhibiteur ou d'un activateur de la PARP, comprenant :

25 - une étape de mesure de l'activité de la PARP, en l'absence d'activateur et d'inhibiteur de PARP, par détection de la liaison entre la PARP et le poly(ADP-ribose) à l'aide d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose),

- une étape de mesure de l'activité de la PARP, en présence d'un activateur ou d'un inhibiteur de la PARP, par détection de la liaison entre la PARP et le poly(ADP-ribose) à l'aide d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose),

30 les deux étapes de mesure définies ci-dessus étant effectuées dans un ordre quelconque,

- et une étape de comparaison des activités de la PARP obtenues respectivement dans chacune des deux étapes définies ci-dessus.

5           6. Procédé de détection de l'activité de la PARP selon la revendication 4, comprenant les étapes suivantes :

- adsorption de la PARP contenue dans un milieu d'adsorption, sur un support,  
- addition, à la PARP adsorbée, d'un milieu de réaction contenant les éléments  
nécessaires à la mise en activité de la PARP, et résultant en la synthèse de  
10 poly(ADP-ribose) et à la liaison du poly(ADP-ribose) à au moins une protéine  
nucléaire acceptrice présente dans le milieu, ou adsorbée,

- addition au milieu contenant la PARP d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose)  
dans des conditions permettant la formation d'un complexe anticorps-antigène avec le  
poly(ADP-ribose) lié à la PARP,

15           - détection de la formation du susdit complexe antigène-anticorps et mesure de  
l'activité enzymatique correspondante de la PARP.

20           7. Procédé de détection de l'activité de la PARP en vue de la détection de  
l'activité inhibitrice ou activatrice d'un inhibiteur ou d'un activateur de la PARP selon  
la revendication 6, comprenant les étapes suivantes :

- adsorption de la PARP contenue dans un milieu d'adsorption, sur un support,  
- addition, à la PARP adsorbée, d'un milieu de réaction contenant

. un inhibiteur ou un activateur de la PARP,

. les éléments nécessaires à la mise en activité de la PARP, et  
résultant en la synthèse de poly(ADP-ribose) et à la liaison du poly(ADP-ribose)  
25 à au moins une protéine nucléaire acceptrice présente dans le milieu,

- addition, au milieu contenant la PARP, d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose)  
dans des conditions permettant la formation d'un complexe anticorps-antigène avec le  
poly(ADP-ribose) lié à la PARP,

30           - détection de la formation du susdit complexe antigène-anticorps, et mesure de  
l'activité enzymatique correspondante de la PARP,

- comparaison de la mesure de l'activité enzymatique de la PARP obtenue lors de la détection de la formation du susdit complexe antigène-anticorps avec la mesure de l'activité enzymatique de la PARP obtenue lors de la détection de la formation du complexe antigène-anticorps obtenu selon la revendication 6.

8. Procédé selon l'une des revendications 6 ou 7, dans lequel la protéine nucléaire acceptrice de poly(ADP-ribose) est la PARP.

9. Procédé selon l'une des revendications 6 ou 7, dans lequel la protéine nucléaire acceptrice de poly(ADP-ribose) est choisie parmi :

- PARP,
- histone(s),
- HMG,
- topoisomérases,
- ADN polymérases,
- ADN ligases.

10. Procédé selon l'une des revendications 6 à 9, dans lequel l'adsorption de la PARP a lieu dans un milieu d'adsorption contenant un composé susceptible de jouer le rôle d'écran entre l'ADN lésé et le polymère de poly(ADP-ribose) tel que la spermine ou la spermidine, ou avantageusement du  $MgCl_2$ , et un agent favorisant la formation de doigts de zinc, avantageusement  $ZnCl_2$ .

11. Procédé selon l'une des revendications 6 à 10, dans lequel le milieu de réaction contenant les éléments nécessaires à la mise en activité de la PARP comprend:

- le substrat de la PARP, avantageusement du  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>,
- un co-facteur de la PARP, avantageusement de l'ADN lésé,
- un agent réducteur, notamment du DTT,
- un composé susceptible de jouer le rôle d'écran entre l'ADN lésé et le polymère de poly(ADP-ribose) tel que la spermine ou la spermidine, ou

avantageusement  $\text{MgCl}_2$  et un agent favorisant la formation de doigts de zinc, avantageusement  $\text{ZnCl}_2$ .

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 11, dans lequel l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) lors de son addition au milieu contenant la PARP est dilué dans un milieu de dilution permettant d'éviter les réactions non spécifiques éventuelles, et avantageusement contenant de la BSA.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 12, dans lequel l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) est un anticorps polyclonal, par exemple l'anticorps LP 96-10 polyclonal commercialisé par BioMol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA, Cat N° SA-276), ou un anticorps induit chez le cochon d'Inde (anticorps polyconal : réf. SA-217, Plymouth Meeting, PA), ou un anticorps non commercial, préparé au laboratoire, ou un anticorps monoclonal tel que l'anticorps 10H commercialisé par Serotec (Cat n° MCA 1480 ; Oxford, UK ou par Travigen Inc., Gaithersburg, MD, USA).

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 13, dans lequel la détection du complexe poly(ADP-ribose)-anticorps anti-poly(ADP-ribose) (premier anticorps) est effectué à l'aide d'un deuxième anticorps dirigé contre l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) et conjugué à une enzyme, et dans lequel la liaison entre l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) et le deuxième anticorps est révélé par exemple par réaction colorimétrique, provoquée par l'addition d'un substrat de l'enzyme et d'un chromogène.

15. Procédé selon l'une des revendications 6 à 14, dans lequel la PARP est utilisée à raison d'environ 200 à environ 600 ng/ml, l'ADN lésé est utilisé à raison d'environ 1 à 1,5  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\text{ZnCl}_2$  est utilisé à raison d'environ 10 à 30  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$  est utilisé à raison d'environ 3 à 5 mM,  $\text{NAD}^+$  25 à 75  $\mu\text{M}$ , DTT est utilisé à raison d'environ 0,8 à 1,2 mM, l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) est utilisé à raison



d'environ 1/500 à environ 1/2000, BSA dans le milieu de dilution de l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) est utilisé à raison d'environ 0,2 à environ 0,6 % (p/v).

5 16. Procédé selon l'une des revendications 6 à 15, de détection de l'activité enzymatique de la PARP comprenant les étapes suivantes :

- adsorption de la PARP contenue dans un milieu d'adsorption, sur des plaques de microtitration en plastique, et lavage de la PARP non adsorbée,

- addition, à la PARP adsorbée, d'un milieu de réaction contenant les éléments nécessaires à la mise en activité de la PARP, et notamment du ADN lésé, du NAD<sup>+</sup>,  
10 et un composé susceptible d'éviter l'oxydation des résidus de cysteine, conduisant à la synthèse de poly(ADP-ribose) et à la liaison de celui-ci sur une protéine nucléaire acceptrice présente dans le milieu ou adsorbée, notamment la PARP, et lavage des éléments non liés à la PARP,

- addition, au milieu contenant de la PARP, d'un anticorps  
15 anti-poly(ADP-ribose) contenu dans un milieu de dilution pour former un complexe antigène-anticorps avec le poly(ADP-ribose) lié sur la PARP ou sur la protéine acceptrice et lavage de l'anticorps qui n'a pas formé de complexe,

- addition d'un 2ème anticorps spécifique de l'espèce d'origine de l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) conjugué à une enzyme pour former un complexe antigène-  
20 anticorps avec l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) et lavage du deuxième anticorps qui n'a pas formé de complexe,

- addition du substrat au susdit enzyme et d'un chromogène,

- développement de la réaction colorimétrique puis arrêt de cette réaction par  
addition d'une solution acide,

- détermination de l'activité enzymatique de la PARP en mesurant l'intensité de  
25 la réaction par exemple par mesure de la densité optique (DO).

30 17. Procédé selon l'une des revendications 6 à 16, de détection de l'activité enzymatique de la PARP en vue de la quantification de l'activité inhibitrice ou activatrice d'un inhibiteur ou activateur de PARP comprenant les étapes suivantes :

- adsorption de la PARP contenue dans un milieu d'adsorption sur des plaques de microtitration en plastique, et lavage de la PARP non adsorbée,

- addition à la PARP adsorbée d'un milieu de réaction contenant les éléments nécessaires à la mise en activité de la PARP, et notamment du ADN lésé, du NAD<sup>+</sup>, et un composé susceptible d'éviter l'oxydation des résidus de cystéine, conduisant à la  
5 synthèse de poly(ADP-ribose) et à la liaison de celui-ci sur une protéine nucléaire acceptrice présente dans le milieu, ou adsorbée, notamment la PARP, et un inhibiteur ou un activateur de la PARP et lavage des éléments non liés à la PARP,

- addition, au milieu contenant de la PARP, d'un anticorps anti-poly(ADP-ribose) contenu dans un milieu de dilution pour former un complexe  
10 antigène-anticorps avec le poly(ADP-ribose) lié sur la PARP ou sur n'importe quelle protéine acceptrice et lavage de l'anticorps qui n'a pas formé de complexe,

- addition d'un 2ème anticorps spécifique de l'espèce d'origine de l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) conjugué à une enzyme pour former un complexe antigène-  
15 anticorps avec l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) et lavage du deuxième anticorps qui n'a pas formé de complexe,

- addition du substrat du susdit enzyme et d'un chromogène,

- développement de la réaction colorimétrique puis arrêt de cette réaction par  
addition d'une solution acide,

- détermination de l'activité enzymatique de la PARP en mesurant l'intensité de  
20 la réaction par exemple par mesure de la densité optique (DO),

- comparaison des activités enzymatiques de la PARP respectivement obtenues à l'étape précédente et selon la revendication 16.

18. Kit pour la détection de l'activité enzymatique de la PARP, éventuellement  
25 en vue de la détection de l'activité inhibitrice ou activatrice d'un inhibiteur ou d'un activateur de la PARP comprenant :

- l'enzyme PARP,

- les milieux ou tampons nécessaires à l'adsorption de la PARP sur un support utilisable dans un procédé ELISA,

30 - les milieux ou tampons permettant la mise en activité de l'enzyme PARP,

- au moins un anticorps anti-poly(ADP-ribose),

- les milieux ou tampons permettant la dilution du susdit anticorps,

- les milieux ou tampons permettant la formation de complexe antigène-anticorps entre le poly(ADP-ribose) et l'anticorps anti-poly(ADP-ribose),
- éventuellement un deuxième anticorps susceptible de former un complexe avec  
5 l'anticorps anti-poly(ADP-ribose), éventuellement marqué par une enzyme,
- éventuellement le substrat de la susdite enzyme, et un chromogène ainsi que l'acide stoppant la réaction,
- éventuellement les milieux ou tampons permettant la formation d'un complexe  
10 antigène-anticorps entre l'anticorps anti-poly(ADP-ribose) et le susdit deuxième anticorps,
- éventuellement au moins un inhibiteur ou un activateur de la PARP susceptible d'être utilisé comme témoin interne.

1 / 5

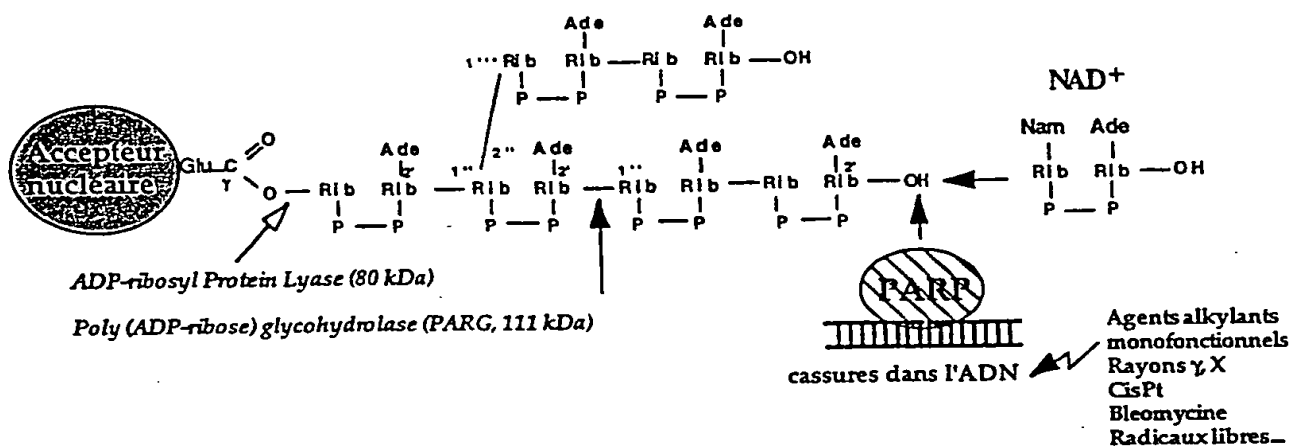


Figure 1A

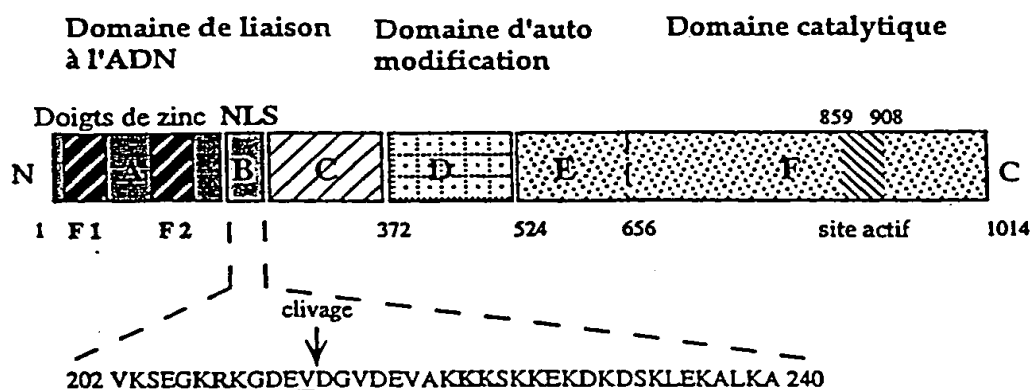


Figure 1B

2 / 5

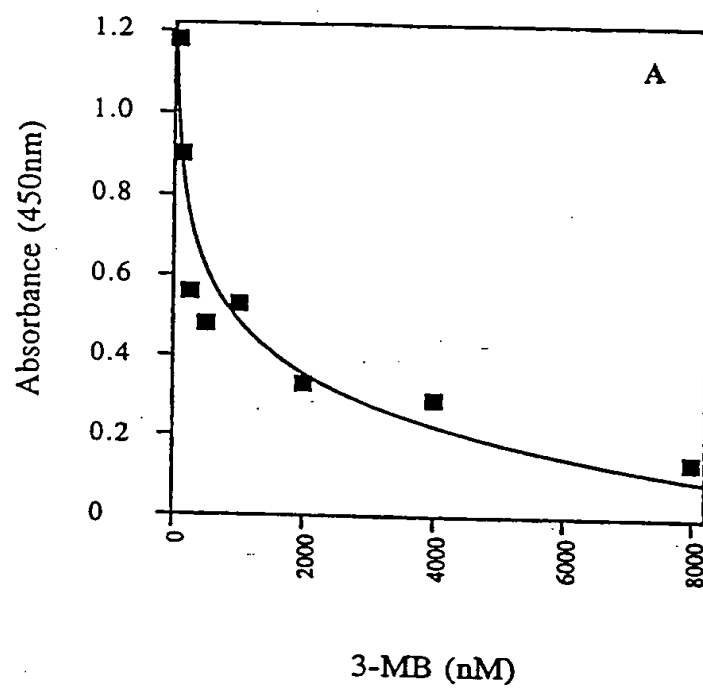


Figure 2A

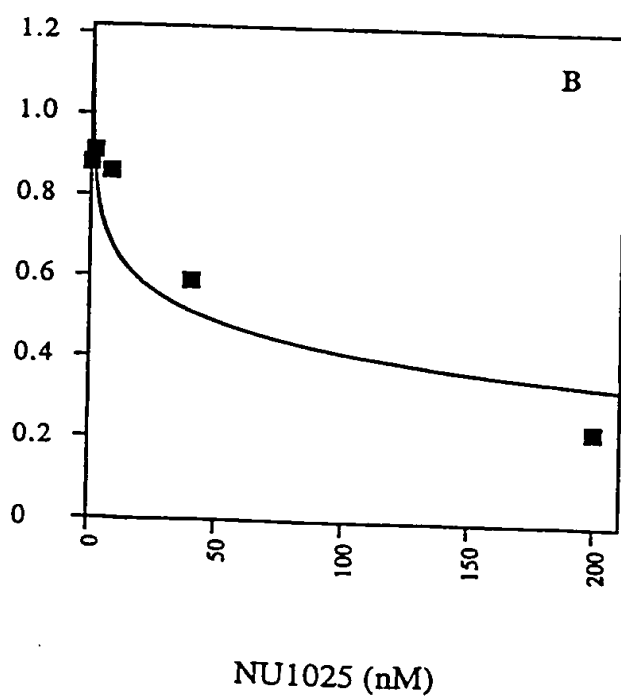


Figure 2B

3 / 5

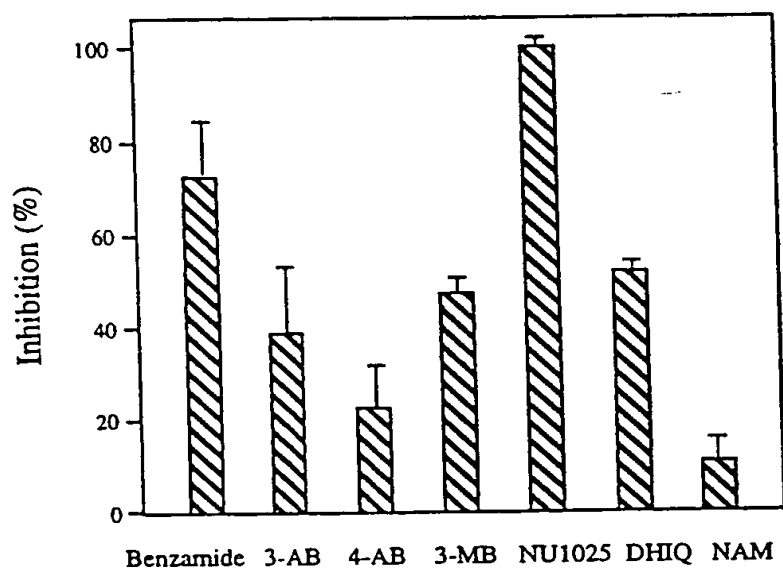


Figure 3

4 / 5

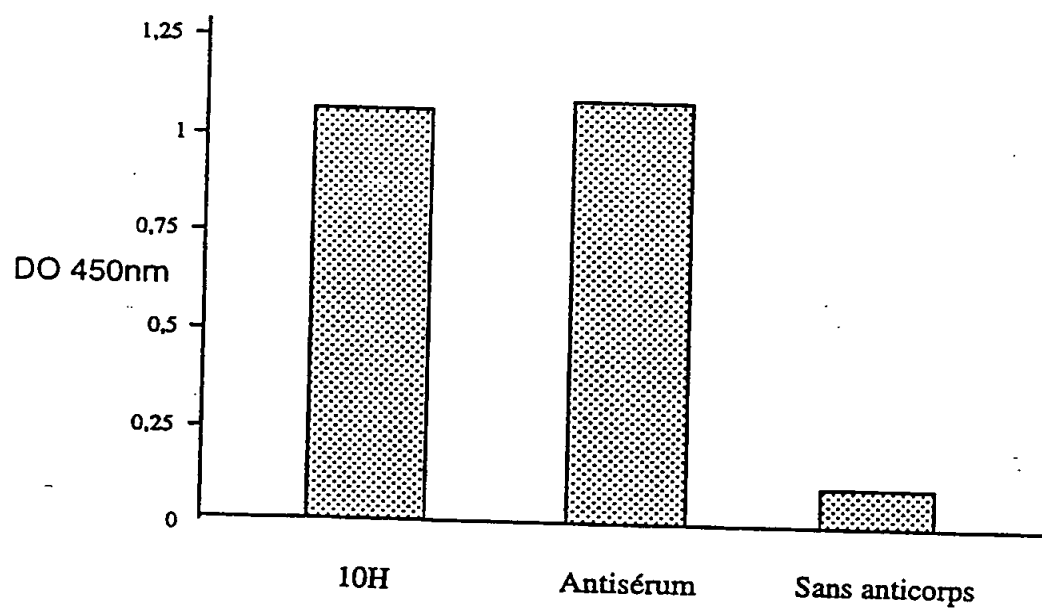


Figure 4

5 / 5

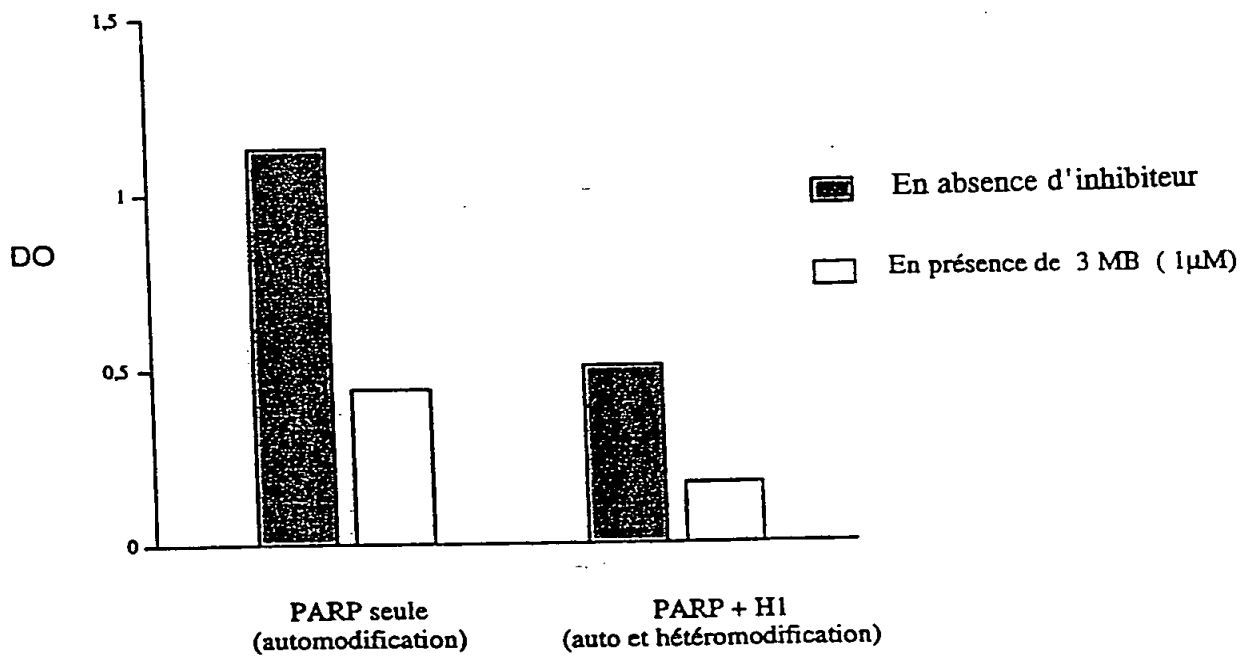


Figure 5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte.      inal Application No  
PCT/FR 99/02456

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7    G01N33/573    C12Q1/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7    G01N    C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IKAI, KOUICHI ET AL: "Poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis in transformed mouse epidermal cells in culture" ACTA HISTOCHEM. CYTOCHEM. (1991), 24(2), 251-5 CODEN: ACHCBO;ISSN: 0044-5991, XP002107949 the whole document	1,4,18
A	BERTON, GIORGIO ET AL: "Activation of human monocyte-derived macrophages by interferon.gamma. is accompanied by increase of poly ( ADP - ribose ) polymerase activity" BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1991), 1091(1), 101-9 CODEN: BBACAQ;ISSN: 0006-3002, XP002107950 abstract	1,4,18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 January 2000

Date of mailing of the international search report

27/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 528 525 A (SCRIPPS RESEARCH INST) 24 February 1993 (1993-02-24) page 3, line 41 -page 4, line 29 ---	1,4,18
A	FR 2 707 011 A (PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS) 30 December 1994 (1994-12-30) abstract -----	1,4,18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02456

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0528525 A	24-02-1993	US 5288612 A	22-02-1994
		AT 160876 T	15-12-1997
		AU 652474 B	25-08-1994
		AU 2317492 A	11-02-1993
		DE 69223355 D	15-01-1998
		DE 69223355 T	28-05-1998
		DK 528525 T	23-02-1998
		EP 0595865 A	11-05-1994
		ES 2109982 T	01-02-1998
		GR 3025752 T	31-03-1998
		WO 9301309 A	21-01-1993
FR 2707011 A	30-12-1994	NONE	

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 G01N33/573 C12Q1/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	IKAI, KOUICHI ET AL: "Poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis in transformed mouse epidermal cells in culture" ACTA HISTOCHEM. CYTOCHEM. (1991), 24(2), 251-5 CODEN: ACHCBO; ISSN: 0044-5991, XP002107949 le document en entier	1,4,18
A	BERTON, GIORGIO ET AL: "Activation of human monocyte-derived macrophages by interferon.gamma. is accompanied by increase of poly ( ADP - ribose ) polymerase activity" BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1991), 1091(1), 101-9 CODEN: BBACAO; ISSN: 0006-3002, XP002107950 abrégé	1,4,18



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée.

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 janvier 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/01/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreno, C

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Denr : Internationale No

PCT/FR 99/02456

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 528 525 A (SCRIPPS RESEARCH INST) 24 février 1993 (1993-02-24) page 3, ligne 41 -page 4, ligne 29 -----	1,4,18
A	FR 2 707 011 A (PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS) 30 décembre 1994 (1994-12-30) abrégé -----	1,4,18

## Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Derr - Internationale No

PCT/FR 99/02456

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0528525 A	24-02-1993	US 5288612 A	22-02-1994
		AT 160876 T	15-12-1997
		AU 652474 B	25-08-1994
		AU 2317492 A	11-02-1993
		DE 69223355 D	15-01-1998
		DE 69223355 T	28-05-1998
		DK 528525 T	23-02-1998
		EP 0595865 A	11-05-1994
		ES 2109982 T	01-02-1998
		GR 3025752 T	31-03-1998
		WO 9301309 A	21-01-1993
FR 2707011 A	30-12-1994	AUCUN	